9 月 September
2020, 63(9): 1059 - 1069
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.09.003

沙葱萤叶甲钙结合蛋白基因的鉴定及表达谱分析

李 爽[1], 李 玲[1], 周晓榕[1], 庞保平[1,*], 单艳敏[2]

(1. 内蒙古农业大学草原昆虫研究中心, 呼和浩特 010020; 2. 内蒙古自治区草原工作站, 呼和浩特 010020)

摘要:【目的】沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 是一种近年来在内蒙古草原上猖獗成灾的新害虫。本研究旨在克隆沙葱萤叶甲钙结合蛋白(calcium-binding protein, CaBP)基因,分析其在沙葱萤叶甲成虫不同发育阶段及不同温度下的表达谱,为进一步探究其在沙葱萤叶甲生长发育及滞育过程中的作用奠定基础。【方法】根据沙葱萤叶甲转录组和蛋白质组数据,筛选 CaBP 基因序列信息,应用 RT-PCR 技术克隆获得 CaBP 基因的开放阅读框(ORF)全长序列,并对其进行生物信息学分析;通过 qPCR 检测其在沙葱萤叶甲成虫不同日龄(羽化后 3, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 和 110 d)及 3 日龄成虫在不同温度(0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 和 35℃)下处理 1 h 后的表达水平。【结果】克隆得到 4 条具有完整 ORF 的沙葱萤叶甲 CaBP 基因 cDNA 序列,分别命名为 *GdCaM*, *GdCAPSL*, *GdTnCl* 和 *GdCRT*(GenBank 登录号: MN695412 - 695415),ORF 全长分别为 480, 648, 516 和 1 209 bp,分别编码 149, 215, 171 和 402 个氨基酸;只有 GdCRT 拥有信号肽。同源序列比对和系统发育分析表明,GdCaM, GdCAPSL, GdTnCl 和 GdCRT 分别与玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 的 CaM, CAPSL, TnCl 及马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* CRT 的氨基酸序列一致性最高,分别为 100.0%, 74.0%, 88.2% 和 92.5%。qPCR 结果表明,4 个 *CaBP* 基因在沙葱萤叶甲不同日龄成虫中均差异表达,且表达模式不同。*GdCaM* 在成虫滞育前(羽化后 3 d)表达量较高,进入滞育后(羽化后 7 d)表达量降低,在滞育期间(羽化后 7 - 60 d)表达量变化较小,而解除滞育后(羽化后 90 d)表达量进一步下调。*GdCAPSL* 在滞育初期(羽化后 10 d)维持在最低水平,进入滞育中后期(羽化后 40 和 60 d)开始回升,滞育解除后又突然下调至最低水平,而羽化后 110 d 急剧上升至最高水平。*GdTnCl* 在滞育初期(羽化后 15 - 20 d)高表达,进入滞育中后期(羽化后30 - 60 d)急剧下降至最低水平,滞育解除后再次上调,但羽化后 110 d 突然下调至最低水平。*GdCRT* 在进入滞育后表达量开始逐渐下调,在滞育维持期间(羽化后 15 - 60 d)维持在低水平,滞育解除后又开始上升。温度对 3 日龄成虫中除 *GdCRT* 外的其他 3 个 *CaBP* 基因的表达有显著影响。温度低于 20℃ 时,*GdCaM* 的表达量随温度的降低而升高,但 0℃ 时突然下降;温度高于 20℃ 时,*GdCaM* 的表达量随着温度的升高而上升。*GdCAPSL* 的表达量随着温度的升高而呈现上升的趋势,25℃ 时达到最高,然后下降。*GdTnCl* 随着温度的升高,表达量呈现下降的趋势。【结论】钙结合蛋白可能在沙葱萤叶甲成虫生长发育及夏滞育调控过程中发挥着重要作用。

关键词: 沙葱萤叶甲; 钙结合蛋白; 基因克隆; 表达谱分析; 夏滞育; 温度

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2020)09-1059-11

Identification and expression profiling of calcium-binding protein genes in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae)

LI Shuang[1], LI Ling[1], ZHOU Xiao-Rong[1], PANG Bao-Ping[1,*], SHAN Yan-Min[2] (1. Research Center for Grassland Entomology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010020, China; 2. Grassland

---

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760517)
作者简介: 李爽, 男, 1995 年 6 月生, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生态与分子生物学, E-mail: 532089033@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: pangbp@imau.edu.cn
收稿日期 Received: 2020-01-13; 接受日期 Accepted: 2020-01-22

Station of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010020, China)

Abstract:【Aim】*Galeruca daurica* is a new pest with great outbreaks in grasslands in Inner Mongolia in recent years. This study aims to clone the calcium-binding protein (CaBP) genes from *G. daurica* and to analyze their expression profiles at different developmental stages of the adults and under different temperatures, so as to lay a foundation for further study on their roles in the growth, development, and diapause of *G. daurica*.【Methods】The full-length ORFs of CaBP genes were cloned from *G. daurica* by RT-PCR according to the sequence information available in the transcriptome and proteome data of *G. daurica*, and their sequences were subjected to bioinformatics analysis. Their expression profiles in different day-old adults (3, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 and 110 d after eclosion) and in the 3-day-old adults exposed to 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35℃, respectively, for 1 h were detected by qPCR.【Results】The cDNA sequences with complete ORFs of four CaBP genes were cloned from *G. daurica*, and named *GdCaM*, *GdCAPSL*, *GdTnCl* and *GdCRT* (GenBank accession numbers: MN695412 – 695415), respectively. Their ORFs are 480, 648, 516 and 1 209 bp in length, encoding 149, 215, 171 and 402 amino acids, respectively, and only GdCRT has a signal peptide. Homologous sequence alignment and phylogenetic analysis indicated that GdCaM, GdCAPSL, GdTnC and GdCRT have the highest amino acid sequence identity with CaM, CAPSL and TnCL of *Diabrotica virgifera virgifera*, and CRT of *Leptinotarsa decemlineata*, respectively (100.0%, 74.0%, 88.2% and 92.5%, respectively). The qPCR results showed that four *CaBP*s were differentially expressed in different day-old adults with diverse expression patterns. The expression level of *GdCaM* was relatively high in adults before diapause (3 d after eclosion), declined in adults beginning to enter diapause (7 d after eclosion), changed faintly during diapause (7 – 60 d after eclosion), and decreased further after diapause termination (90 d after eclosion). The expression levels of *GdCAPSL* maintained low in adults during the early diapause stage (10 d after eclosion), began to increase during the middle and late diapause stages (40 and 60 d after eclosion), and suddenly dropped to the lowest after diapause termination but abruptly rose to the highest 110 d after adult eclosion. The expression of *GdTnCl* was high in adults during the early diapause stage (15 – 20 d after eclosion), rapidly down-regulated to the lowest levels during the middle and late diapause stages (30 – 60 d after eclosion), up-regulated again after diapause termination, and suddenly down-regulated to the lowest level 110 d after adult eclosion. The expression levels of *GdCRT* in adults started to decrease gradually after diapause initiation, kept low during diapause maintenance (15 – 60 d after eclosion), and began to increase again after diapause termination. Temperature affected significantly the expression levels of the other three CaBP genes except for *GdCRT* in the 3-day-old adults. The expression levels of *GdCaM* rose with temperature declining when the temperature was below 20℃, but abruptly dropped at 0℃, while increased with temperature rising when temperature was above 20℃. The expression levels of *GdCAPSL* had an increasing tendency with temperature increasing, reached the highest at 25℃, and then declined. The expression levels of *GdTnCl* had a decreasing tendency with temperature increasing.【Conclusion】CaBPs might play important roles in the growth, development, and regulation of summer diapause of *G. daurica* adults.

Key words: *Galeruca daurica*; calcium-binding protein; gene cloning; expression profiling; summer diapause; temperature

Ca^{2+}是一种多功能的第二信使，在生物体的发育过程和对各种环境刺激的反应中起着至关重要的作用（Berridge *et al*., 2000）。钙结合蛋白（calcium-binding protein, CaBP）作为 Ca^{2+} 信号的受体，通过构象改变和活性变化识别并传递特异的 Ca^{2+} 信号至下游，引起下游特定的反应变化（汪澈等，2009）。最常见的钙结合蛋白类型是具有 1 个或多个典型的螺旋-环-螺旋延长因子（EF-hand）基序（helix-loop-

helix elongation factor hand motifs）的蛋白，由 E 螺旋和 F 螺旋组成，位于钙离子结合环的侧面，该结构类似于手型（Ababou and Zaleska, 2015）。细胞中还有一些蛋白虽然没有 EF-hand 结构，但依然可以和 Ca^{2+} 结合，包括与磷酸烯醇丙酮酸羧酶激酶相关的激酶（phosphoenolpyruvate carboxylase kinase-related kinase, PEPRK）、膜联蛋白（annexin）、钙联蛋白（calnexin）、钙网蛋白（calreticulin, CRT）和磷酸酶 D（phospholipase D）等。虽然已经对钙结合蛋白的功能开展了研究，但对许多细节和基因组信息仍然缺乏了解（Mohanta *et al*., 2019）。钙调蛋白（calmodulin, CaM）是真核生物钙结合蛋白 EF-hand 家族中了解最详细的成员，其参与各种生理活动，包括新陈代谢、免疫反应、细胞凋亡、胞内运动、神经生长和肌肉收缩等（Haeseleer *et al*., 2002; Tidow and Nissen, 2013）。CaM 在昆虫发育变态（Jing *et al*., 2015）、嗅觉（Bahk and Jones, 2016; Mukunda *et al*., 2014, 2016）、味觉（Seno *et al*., 2005）、卵黄生成（Brown *et al*., 2010; Brubaker-Purkey and Woodruff, 2013; Wang *et al*., 2018）、抗药性（Guo *et al*., 2019）以及昆虫与寄主植物相互作用（Hattori *et al*., 2012; Ye *et al*., 2017）中可能起着重要作用。钙磷蛋白（calcyphosine, CAPS）是一类在哺乳动物及后生动物中新发现的钙结合蛋白，含有 EF-hand 基序，与 CaM 属同一蛋白家族。虽然目前对其确切的功能还不清楚，但可能参与了 cAMP 和钙-磷脂酰肌醇级联之间的交叉信号传递，而 cAMP 和钙-磷脂酰肌醇级联则是控制细胞生长和分化最为重要的途径（鞠川等, 2006）。Lindner 等（2019）从脂肪过多症患者体内鉴定出一种类钙磷蛋白（calcyphosine-like, CAPSL），其参与了脂肪的形成。肌钙蛋白（troponin）是调节肌肉收缩的钙感知（Ca^{2+}-sensing）分子开关，是由肌钙蛋白 C（troponin C, TnC）、肌钙蛋白 T（troponin T, TnT）和肌钙蛋白 I（troponin I, TnI）3 个亚基构成的三聚复合体，其中 TnC 为具有 EF-hand 基序的钙结合亚基，是细胞内钙离子浓度改变诱导肌肉收缩的关键功能组分（Umasuthan *et al*., 2013）。目前，大部分关于 TnC 的研究集中于脊椎动物，昆虫 TnC 的研究很少。Fyrberg 等（1994）分离了黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 3 个 TnC 亚型；Chen 等（2008）研究表明家蚕 *Bombyx mori* 的 BmTnC 在头部、马氏管、体壁和肠道等不同组织中差异表达。CRT 是一类内质网中的多功能钙结合蛋白，广泛存在于包括哺乳动物、昆虫、线虫、原生动物及植物等各种生物中，属于（K/H）DEL 蛋白家族（Michalak *et al*., 1992, 1999），在蛋白合成和折叠期间内质网质量控制中起着重要作用（Ramos *et al*., 2011）。在昆虫中，CRT 可能参与嗅觉（Stoltzfus *et al*., 2003）、免疫反应（Choi *et al*., 2002; Asgari and Schmidt, 2003; Zhang *et al*., 2006; Wang *et al*., 2012）及早期发育（Ramos *et al*., 2011）。滞育是昆虫应对不良环境条件的生活策略，在昆虫生长发育和存活过程中起着重要作用。然而，目前我们对 Ca^{2+} 信号在昆虫滞育中的调控作用很少了解。新近研究表明，在棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Lu and Xu, 2010; Zhang *et al*., 2012）、二斑叶螨 *Tetranychus urticae*（Zhao *et al*., 2017）、家蚕（Hsieh and Gu, 2019）和淡色库蚊 *Culex pipiens pallens*（Zhang *et al*., 2019）等滞育过程中许多钙结合蛋白差异表达，意味着其在昆虫滞育调控中可能起着重要作用。

沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* 是一种近年来在内蒙古草原上猖獗成灾的新害虫，自 2009 年在内蒙古锡林郭勒草原突然暴发成灾以来，发生范围不断扩大，危害日趋严重，目前已扩散到锡林郭勒盟、乌兰察布市、呼伦贝尔市、巴彦淖尔市、鄂尔多斯市和阿拉善盟等 6 个盟市的 20 多个旗县。该虫发生于荒漠草原和退化草原，取食百合科葱属 *Allium* 沙葱 *A. mongolium*、多根葱 *A. polyrhizum* 和野韭 *A. ramosum* 等植物，使本已脆弱的草原生态环境更加恶化（谭瑶等, 2017）。该虫一年发生 1 代，春季越冬卵最早于 4 月上中旬开始孵化，夏季成虫羽化约 7～10 d 后进入专性滞育，羽化约 80～90 d 后解除滞育，开始取食、交尾和产卵，以卵滞育越冬（吴翔等, 2015; Zhou *et al*., 2016; 陈龙等, 2018b）。目前在昆虫纲中以卵冬滞育同时以成虫夏滞育的昆虫未见有过报道，沙葱萤叶甲为研究滞育提供了很好的研究材料。然而，目前对其滞育机理了解得还很少。本实验室前期研究了成虫不同夏滞育阶段体内糖类、蛋白、脂肪含量（陈龙等, 2018b）及海藻糖酶（陈龙等, 2018a）和热激蛋白（陈龙等, 2019）基因表达量的变化。蛋白质组学分析发现，多个钙结合蛋白在沙葱萤叶甲成虫夏滞育不同阶段差异表达（Ma *et al*., 2019）。本研究根据本实验组装的沙葱萤叶甲转录组和蛋白质组数据，应用生物信息学和 RT-PCR 方法克隆获得沙葱萤叶甲钙结合蛋白基因序列，对其序列特征进行生物信息学分析，并利用 qPCR 技术检测其在成虫滞育过程中及不同温度下的表达模式，为进一步明确钙结合蛋白在沙葱萤叶

甲滞育调控中的作用奠定必要的基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

2019 年 5 月于内蒙古锡林郭勒盟镶黄旗采集沙葱萤叶甲幼虫,置于室内自然变温条件下以野韭为食饲养,待羽化为成虫后作为供试虫源。取 3 日龄成虫雌雄各 2 头混样作为基因克隆的 cDNA 模板。qPCR 实验包括两类样品:(1)不同温度处理样品:选取羽化后 3 日龄成虫,分别放置在 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 及 35℃的低温培养箱(LRH-100CB 型,上海一恒仪器公司)中处理 1 h;(2)不同日龄成虫样品:选取羽化 3, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 和 110 d 的成虫作为供试虫源,其中羽化后 3 d 的成虫处于滞育前,羽化后 7 d 开始进入滞育期(7 – 20 d 为滞育初期、30 – 40 d 为滞育中期、60 d 为滞育后期),羽化后 90 d 滞育终止。每个处理 3 个生物学重复,每个重复雌雄各 2 头。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

以 1.1 节收集的虫源为模板,按照 RNAiso Plus (TaKaRa,大连)操作说明提取总 RNA。提取的总 RNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计(Nano Photometer™-Class,德国)检测总 RNA 质量、浓度和纯度。分别取 1 μg 总 RNA 为模板,按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa,大连)操作说明合成 cDNA 第 1 链,放置 –20℃保存备用。

1.3 钙结合蛋白基因的克隆

根据本实验室组装的沙葱萤叶甲转录组和蛋白质组数据,筛选关于钙结合蛋白的全部序列,选取 4 个具有完整开放阅读框(ORF)的钙结合蛋白基因序列,利用 Primer Primer 5.0 设计引物(表 1)。扩增反应体系(25 μL):cDNA 模板 1 μL, PCR Master Mix 12.5 μL, 上下游引物(0.2 μmol/L)各 1 μL, RNase-free Water 9.5 μL。PCR 扩增条件:94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 30 个循环; 72℃延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖电泳检测后,胶回收目的片段。将回收的目的片段与 pMD® 19-T 连接,转入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞,经蓝白斑筛选,挑选白色菌落进行 PCR 验证,将验证过的菌液继续过夜培养过夜后,送至上海生工公司进行测序。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列(5′–3′) Primer sequences	引物用途 Use of primers
CaM-F	AACGAGAAAAGACAGTTGGC	
CaM-R	GAAAATGCAACTCTTGTGGT	
CAPSL-F	TCAAAGTGAAAAGCGAAGTT	
CAPSL-R	GGAATCACAGATACTCCCTG	基因片段扩增 Amplification of gene fragments
TnCl-F	TGTTACAAAACTTAGTGAGG	
TnCl-R	TTGTAATTTATTTATCGTGC	
CRT-F	ATTCATCGTGCTCACTTTCA	
CRT-R	ATCGCAGTATTCCATCTGTC	
qCaM-F	TCGATAAAGACGGCGATGGT	
qCaM-R	GCAGAGATAAAACCGTTACCGT	
qCAPSL-F	TGACGTCAGAGCAGATCCTC	
qCAPSL-R	TGACGCACTTACTCCAGCAT	qPCR 中目的基因扩增 Amplification of target genes in qPCR
qTnCl-F	ACCAGCACCAGTCACCAAT	
qTnCl-R	CCTCTAGCTCCTGTGGTGTC	
qCRT-F	GATATTTGTGGACCCGGCAC	
qCRT-R	GAAGGTCCCAATCAGCCTCT	
qSDHA-F	GGGAGACCACAATCTCCTCA	qPCR 中内参基因扩增
qSDHA-R	AGCTGGTGCTCCTAAGTCCA	Amplification of the reference gene in qPCR

1.4 序列分析及系统发育树构建

利用 NCBI 数据库中 ORF Finder 对沙葱萤叶甲钙结合蛋白基因的开放性阅读框进行预测(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/);利用 DNAMAN 6.0 软件进行分子量及理论等电点的预测;利用 SingalP 5.0 软件进行信号肽预测(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/);利用 TMHMM Server 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)进行

跨膜区的预测；利用 Scan Prosite（https：// prosite. expasy. org/）对蛋白结构域预测。利用 MEGA 6.0 软件的邻接法（重复运行 1 000 次）构建系统发育树。

1.5　钙结合蛋白基因表达谱 qPCR 分析

qPCR 反应体系（20 μL）：模板 cDNA 2 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.4 μL，GoTaq® qPCR Master Mix（2×）10 μL（Promega，美国），Nuclease-Free Water 7.2 μL。选用沙葱萤叶甲 *SDHA*（GenBank 登录号：KU240575）作为内参基因（Tan *et al*.，2017），每个处理 3 次生物学重复及 3 次技术重复。使用 qPCR 仪（FTC-3000，Funglyn Biotech，加拿大）进行测定。反应程序：95℃预变性 10 min；95℃变性 15 s，60℃退火 1 min，40 个循环；95℃变性 15 s，60℃退火 15 s，95℃延伸 15 s。

1.6　数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法（Livak and Schmittgen，2001）测定沙葱萤叶甲钙结合蛋白的相对表达量，不同日龄成虫及不同温度下钙结合蛋白的相对表达量差异显著性分析采用单因素方差分析（one-way ANOVA）和 Duncan 氏新复极差法。运用 SPSS 22.0 统计分析软件对数据进行分析，数据以平均值±标准误表示。

2　结果

2.1　沙葱萤叶甲钙结合蛋白基因的鉴定及序列特征

通过对沙葱萤叶甲成虫转录组数据的 BlastX 比对分析，经 RT-PCR 克隆、测序验证及生物信息学分析获得 4 个具有完整开放阅读框（ORF）的钙结合蛋白基因序列，依次命名为 *GdCaM*，*GdCAPSL*，*GdTnCl* 和 *GdCRT*（GenBank 登录号：MN695412－MN695415）。ORF 全长分别为 450，648，516 和 1 209 bp，分别编码 149，215，171 和 402 个氨基酸残基，预测蛋白质分子量分别为 16.81，24.34，19.67 和 46.43 kD，等电点 pI 分别为 3.84，4.57，3.95 和 4.17。GdCaM，GdCAPSL 和 GdTnCl 无信号肽，分别与玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* CaM，CAPSL 和 TnCl 的氨基酸序列一致性最高，分别为 100%，74.0% 和 88.2%；GdCRT 与马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* CRT 的氨基酸序列一致性最高（92.5%）。根据 EF-hand 基序的共有序列 D-x-DNE-x-DNS-GP-x-ILVFM-DSE-x-x-DE（x 代表任意氨基酸），运用 Scan Prosite 在线软件分析显示（图 1）：GdCaM 有 4 个典型的结构和功能性 EF-hand 基序；GdCAPSL 有 3 个 EF-hand 基序，其中 EF-hand 4 基序缺失[EF-hand 基序氨基酸被替代，其中第 1 位的甘氨酸（Gly）替代了天冬氨酸（Asp），第 3 位的苏氨酸（Thr）替代了天冬氨酸/天冬酰胺（Asn）/谷氨酸（Glu）]；GdTnCl 只有 2 个 EF-hand 基序，其中 EF-hand 1 和 EF-hand 3 基序均缺失[EF-hand 1 基序第 5 位的赖氨酸（Lys）替代了天冬氨酸/天冬酰胺（Asn）/丝氨酸（Ser），第 6 位的谷氨酰胺（Glu）替代了甘氨酸（Gly）/脯氨酸（Pro），第 12 位的蛋氨酸（Met）替代了谷氨酸（Glu）/天冬氨酸（Asp）；EF-hand 3 基序第 5 位的亮氨酸（Leu）替代了天冬氨酸/

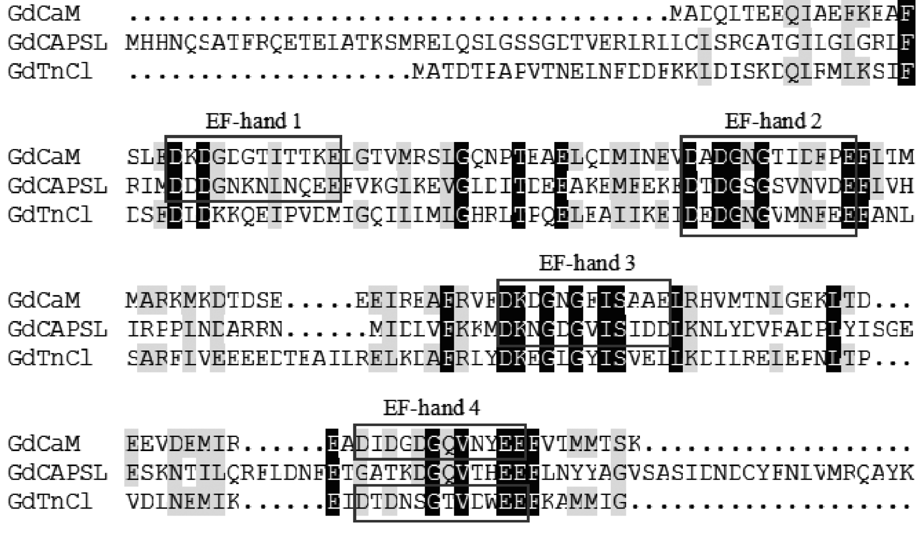


图 1　沙葱萤叶甲 EF-hand 钙结合蛋白序列分析

Fig. 1　Sequence analysis of EF-hand calcium-binding proteins in *Galeruca daurica*

方框显示预测的 4 个 EF-hand 基序。Four predicted EF-hand motifs are shown in the box.

天冬酰胺(Asn)/丝氨酸(Ser),第 12 位的亮氨酸替代了谷氨酸(Glu)/天冬氨酸(Asp)]。GdCRT 不具有 EF-hand 基序,但 GdCRT 具有 2 条典型的钙网蛋白(CRT)家族标签序列(K[97] HEQNIDCGGGYVKVF[112] 和 L[129] MFGPDiCG[137])、三重复序列(I[207] kDPEAKKPEDWD[219], I[224] PDPDDTKPEDWD[236] 和 I[241] PDPDATKPDDWD[253])及内质网滞留信号序列 HDEL(图 2)。

```
1     ATGAAATATTTTACAGTTCTTGTGATTTTTGCATATCTGTATGCAGTCAACGCTAATGTGTATTTAGAAGAAAAATTCAACGAT
1      M  K  Y  F  T  V  L  V  I  F  A  Y  L  Y  A  V  N  A  N  V  Y  L  E  E  K  F  N  D
85    GATTCTTGGGAAAAGAACTGGATTTACAGCAAACACCCTGGCAAAGAATTTGGAAAATTCGTTAGGACAGCTGGAAAATTCTTC
29     D  S  W  E  K  N  W  I  Y  S  K  H  P  G  K  E  F  G  K  F  V  R  T  A  G  K  F  F
169   AATAATGAGGAAGAAGACAAAGGTATTCAAACATCTGAAGATGCTAGATTCTATGCATTGAGCAGAAAATTCAAGCCTTTCTCC
57     N  N  E  E  E  D  K  G  I  Q  T  S  E  D  A  R  F  Y  A  L  S  R  K  F  K  P  F  S
253   ACTGAAGGCAAAGATCTTGTTGTCCAGTTTACTGTAAAACATGAACAAAATATTGATTGTGGAGGTGGTTATGTAAAAGTATTT
85     T  E  G  K  D  L  V  V  Q  F  T  V  K  H  E  Q  N  I  D  C  G  G  G  Y  V  K  V  F
337   GATTGTTCTTTGAATCCAGAGGAAATGCATGGAGATTCTCCATACAGACTTATGTTTGGCCCTGATATTTGTGGACCCGGCACT
113    D  C  S  L  N  P  E  E  M  H  G  D  S  P  Y  R  L  M  F  G  P  D  I  C  G  P  G  T
421   AAGAAAGTTCATGTTATTCTTAATCACAAGGATAAGAATGTTCTCATCAACAAGGACATCAGATGTAAGGATGATGTTTACACT
141    K  K  V  H  V  I  L  N  H  K  D  K  N  V  L  I  N  K  D  I  R  C  K  D  D  V  Y  T
505   CATGCCTACACTCTCATTATTCGTCCTGACAATACTTATGAAGTACAAATTGATGGCGAAAAAGTAGAATCTGGAGAATTAGAG
169    H  A  Y  T  L  I  I  R  P  D  N  T  Y  E  V  Q  I  D  G  E  K  V  E  S  G  E  L  E
589   GCTGATTGGGACCTTCTTCCTCCCAAGAAAATCAAGGATCCTGAAGCCAAGAAACCAGAAGACTGGGATGATAGAGCTACCATC
197    A  D  W  D  L  L  P  P  K  K  I  K  D  P  E  A  K  K  P  E  D  W  D  D  R  A  T  I
673   CCTGATCCTGATGACACAAAACCAGAAGATTGGGATAAGCCGGAACATATTCCAGACCCAGATGCCACCAAACCTGATGATTGG
225    P  D  P  D  D  T  K  P  E  D  W  D  K  P  E  H  I  P  D  P  D  A  T  K  P  D  D  W
757   GATGATGAAATGGATGGTGAATGGGAACCACCAATGATTGATAACCCAGAATTCAAGGGAGACTGGAAACCAAAACAAATTGAT
253    D  D  E  M  D  G  E  W  E  P  P  M  I  D  N  P  E  F  K  G  D  W  K  P  K  Q  I  D
841   AACCCTGCTTATAAAGGTGCTTGGGTACATCCTGAAATTGATAATCCTGAATACAGCCCTGAACCTGAACTCTACAAACAAAAA
281    N  P  A  Y  K  G  A  W  V  H  P  E  I  D  N  P  E  Y  S  P  E  P  E  L  Y  K  Q  K
925   GAAATCTGTGGATTAGGTTTCGATTTATGGCAAGTAAAATCTGGTACCATTTTTGATAATGTCCTCATCACAGACGATGTAGAA
309    E  I  C  G  L  G  F  D  L  W  Q  V  K  S  G  T  I  F  D  N  V  L  I  T  D  D  V  E
1009  TATGCTAAGAACGCTTTGGCCGGACTCAAAGAAACACAAGAAGGTGAAAAGAAAGCTAAAGAAGAACAAGATAAAGCAGAAGTA
337    Y  A  K  N  A  L  A  G  L  K  E  T  Q  E  G  E  K  K  A  K  E  E  Q  D  K  A  E  V
1093  GAAGCTGCTAGTGAATATGATAAGAAAGATGATGAAGATGAGGACGATGATGATGATGAAGATGCAAATGAAGAAAAAGTGCCA
365    E  A  A  S  E  Y  D  K  K  D  D  E  D  E  D  D  D  D  D  E  D  A  N  E  E  K  V  P
1177  CAAGTTGATGAAAGTGAGCACGATGAATTATAA
393    Q  V  D  E  S  E  H  D  E  L  *
```

图 2 沙葱萤叶甲钙网蛋白 GdCRT 序列分析

Fig. 2 Sequence analysis of calreticulin (GdCRT) in *Galeruca daurica*

方框表示钙网蛋白家族标签序列,下划线序列表示信号肽,波浪线序列为重复序列,双下划线序列表示内质网滞留信号序列。The calreticulin family signatures are boxed, the signal peptide sequence is underlined, the repeat sequence is wavy lined, and the endoplasmic reticulum retention signal sequence is double underlined.

2.2 沙葱萤叶甲及其他鞘翅目昆虫钙结合蛋白的系统发育关系

将沙葱萤叶甲钙结合蛋白氨基酸序列与 NCBI 数据库中已知的其他鞘翅目钙结合蛋白氨基酸序列构建系统树,结果图 3 表明:具有 EF-hand 基序的 GdCaM, GdCAPSL 和 GdTnCl 分别与其他鞘翅目昆虫的 CaM, CAPSL 和 TnCl 各构成一个分支,其中 GdCaM 置信度均为 100%,在进化过程中具有高度保守的进化特征;不同昆虫 TnCl 间保守性较高,置信度介于 47% ~99% 之间,其中 GdTnCl 与玉米根萤叶甲的 TnCl 亲缘关系最近,最先聚在一起。这 3 类具有 EF-hand 基序的钙结合蛋白亲缘关系较近,共同聚为一个大分支,最后与 CRT 聚在一起。GdCRT 与其他鞘翅目昆虫的 CRT 单独聚为一个分支,但不同昆虫 CRT 间的亲缘关系较远,置信度较低。

2.3 沙葱萤叶甲钙结合蛋白基因在不同日龄成虫中的表达分析

qPCR 结果(图 4)表明,*GdCaM*, *GdCAPSL*, *GdTnCl* 和 *GdCRT* 在不同日龄成虫中的表达量存在显著差异($P < 0.05$),且表达模式不同。*GdCaM* 在成虫滞育前(羽化后 3 d)表达量最高,开始进入夏滞育后(羽化后 7 d)表达量降低,在滞育期间(羽化后 7 -60 d)变化较小,而解除滞育后(羽化后 90 d)表达量又显著下调(图 4: A)。*GdCAPSL* 在成虫羽化后表达量逐渐下降,在滞育初期(羽化后 10 d)维持在最低水平,进入滞育中后期(羽化后 40 d 和 60 d)开始回升,滞育解除后又突然下调至最低水平,而羽化后 110 d 急剧上升至最高水平(图 4: B)。*GdTnCl* 随成虫发育上调表达,在滞育初期(羽化后 15 -20 d)达最高水平,进入滞育中后期(羽化后 30 -60 d)急剧下降至最低水平,滞育解除后再次上调,但在羽化后 110 d 突然下调至最低水平(图 4: C)。*GdCRT* 在进入滞育后表达量开始逐渐下调,在滞育维持期(羽化后 15 -60 d)维持在低水平,滞育解除后又开始上升(图 4: D)。

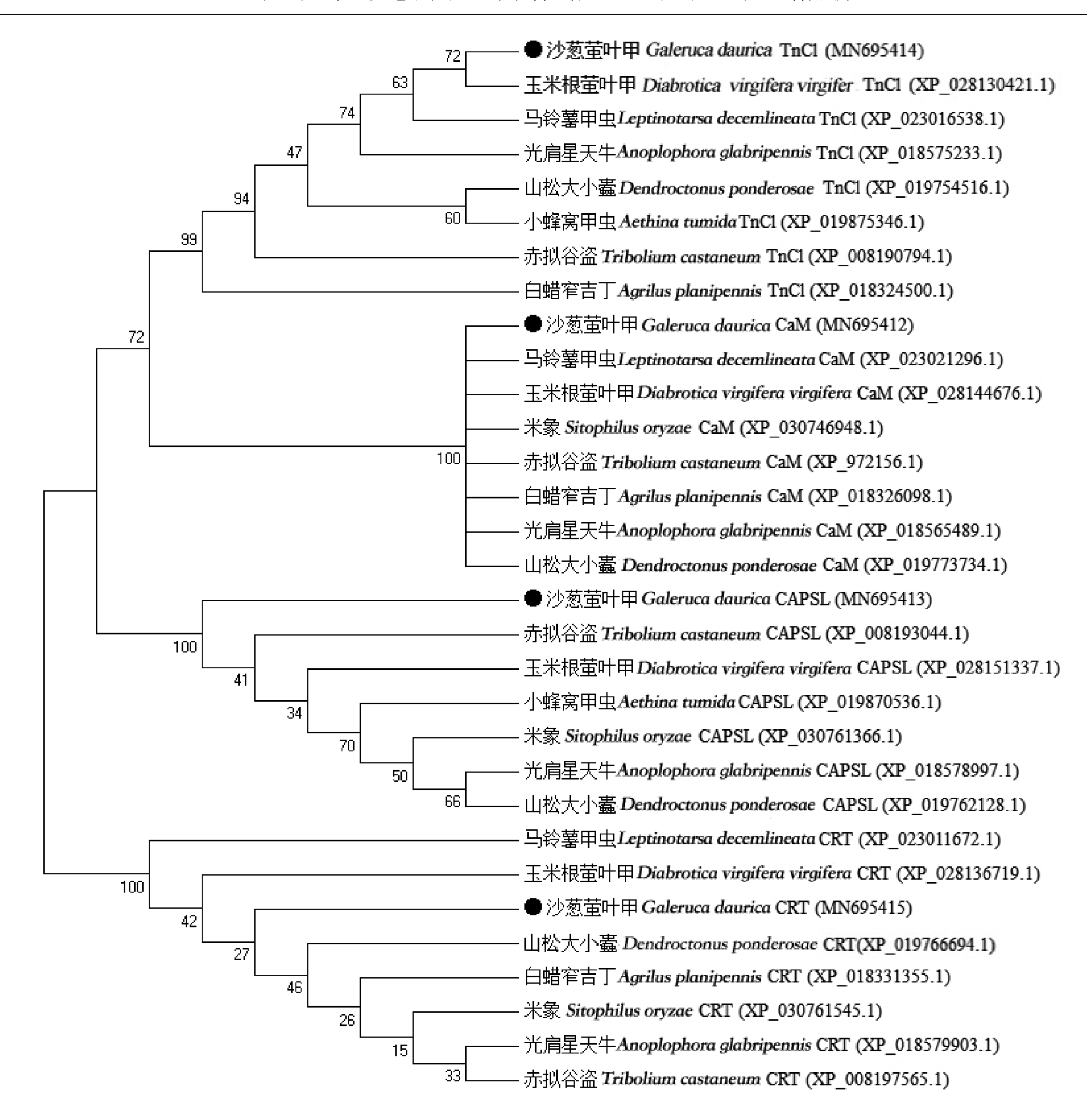


图 3　邻接法构建的基于氨基酸序列的沙葱萤叶甲及其他鞘翅目昆虫钙结合蛋白系统发育树(1 000 次重复)

Fig. 3　Phylogenetic tree of calcium-binding proteins from *Galeruca daurica* and other coleopteran insects constructed by neighbor-joining method based on the amino acid sequences (1 000 replicates)

2.4　沙葱萤叶甲钙结合蛋白在不同温度胁迫下的表达分析

从图 5 可知,温度对除 *GdCRT* 外的其他 3 种钙结合蛋白基因(*GdCaM*, *GdCAPSL* 和 *GdTnCl*)表达量均有显著影响($P < 0.05$)。当温度高于 20℃,随着温度的逐渐上升,*GdCaM* 的表达量逐渐上升;当温度低于 20℃时,随着温度的逐渐降低,*GdCaM* 的表达量上调,在 5℃达到最高值,但 0℃时又突然下降到最低值(图 5:A)。*GdCAPSL* 的表达量随着温度的升高而呈现上升的趋势,25℃时达到最高,然后下降(图 5:B)。*GdTnCl* 在 0℃时表达量最高,随着温度的升高,表达量呈现整体降低的趋势(图 5:C)。

3　讨论

根据沙葱萤叶甲转录组和蛋白质组数据,本研究首次鉴定和克隆得到 4 条具有完成 ORF 的钙结合蛋白基因 cDNA 序列,其中 3 条编码的蛋白属于具有典型 EF-hand 结构域的钙结合蛋白家族,另一条编码的蛋白为不含 EF-hand 结构域但具有钙结合能力的钙网蛋白(CRT)。氨基酸序列比对分析表明,沙葱萤叶甲 GdCaM 序列与其他鞘翅目昆虫 CaM 的完全相同,均具有 4 个典型的 EF-hand 基序,进一步说明 CaM 具有高度保守的进化特征(李庆伟等, 2017)。我们从沙葱萤叶甲转录组数据库 BLAST 获

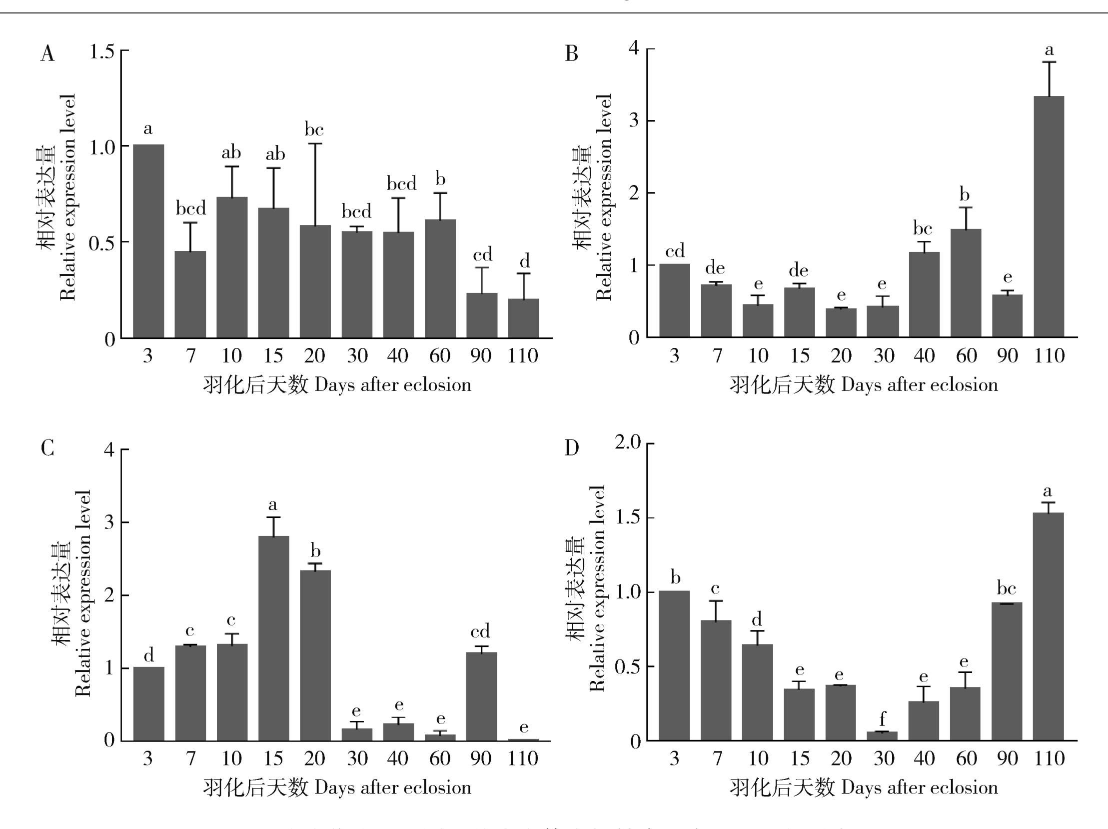


图 4 沙葱萤叶甲不同日龄成虫体内钙结合蛋白基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of calcium-binding protein genes in different day-old adults of *Galeruca daurica*

A: *GdCaM*; B: *GdCAPSL*; C: *GdTnCl*; D: *GdCRT*. 成虫羽化后 3 d 为滞育前期,羽化后 7 d 开始进入滞育期(7 - 20 d 为滞育初期、30 - 40 d 为滞育中期、60 d 为滞育后期),羽化 90 d 后开始滞育解除。图中数据为平均值 ± 标准误;柱上不同字母表示不同发育阶段间基因表达量差异显著($P<0.05$, Duncan 氏新复极差法);图 5 同。Adults at 3 d after eclosion were before diapause, those at 7 d after eclosion began to enter diapause (7 - 20 day-old: early diapause stage; 30 - 40 day-old: middle diapause stage; 60 day-old: late diapause stage), and those at 90 d after eclosion began to terminate diapause. Data in the figure are mean ± *SE*. Different letters above bars indicate significant difference in the gene expression level between different developmental stages ($P<0.05$, Duncan's new multiple range method). The same for Fig. 5.

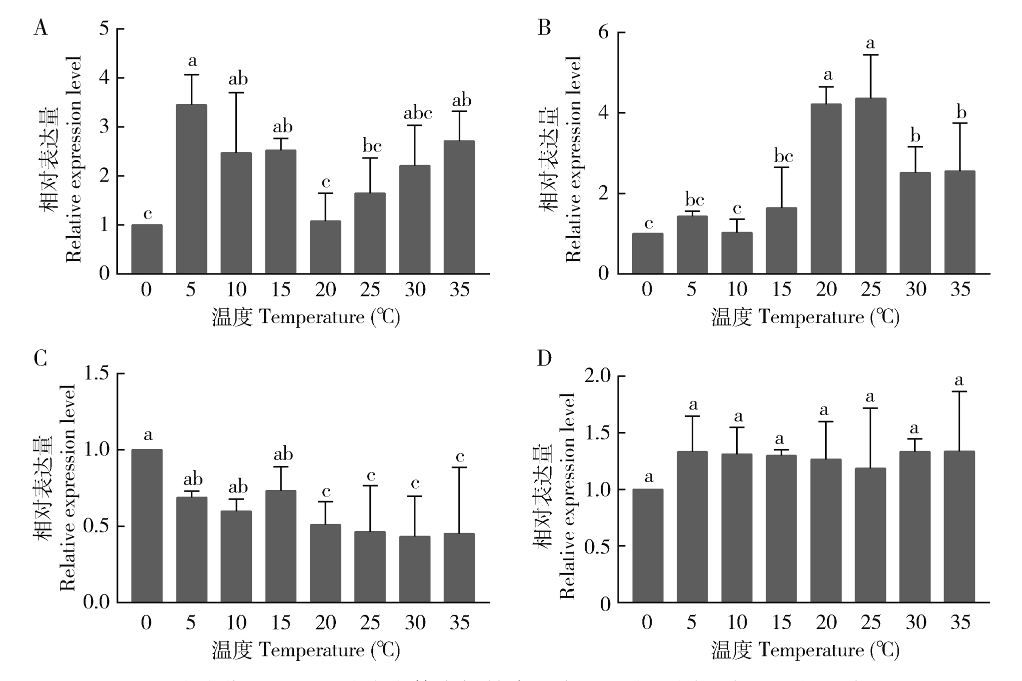


图 5 沙葱萤叶甲 3 日龄成虫体内钙结合蛋白基因在不同温度下的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of calcium-binding protein genes in the 3-day-old adults of *Galeruca daurica* at different temperatures

A: *GdCaM*; B: *GdCAPSL*; C: *GdTnCl*; D: *GdCRT*.

得一条类似钙磷蛋白（calcyphosine-like，CAPSL）的序列，其与同属萤叶甲亚科的玉米根萤叶甲 CAPSL 一致性最高（74%），命名为 GdCAPSL。结构域分析表明，GdCAPSL 具有 3 个典型的 EF-hand 基序，而 CAPS 与 CaM 一样具有 4 个 EF-hand 基序（鞠川等，2006）。TnC 也是具有 4 个典型的 EF-hand 基序的钙结合蛋白，但由于一些 TnC 中某些基序上的钙离子结合所必需的氨基酸残基发生突变，使得其失去 2 个甚至更多的钙离子结合位点（Qiu *et al*.，2003）。本研究获得的沙葱萤叶甲 TnC 失去 2 个钙离子结合位点，只剩 2 个 EF-hand 基序，且与玉米根萤叶甲 TnCl 的氨基酸序列一致性最高（88.2%），因而命名为 GdTnCl。CRT 是不具有 EF-hand 结构域的钙结合蛋白，但至少具有 3 个典型的功能结构域：（1）N 端结构域：具有一段信号肽、2 条保守的钙网蛋白家族标签序列 KHEQNIDCGGGY 和 IMFGPDICG；（2）P 端结构域：富含脯氨酸，并有 1 个高亲和性、低容量的钙离子结合位点和 2 组三重复序列；（3）C 端结构域：拥有一个高容量、低亲和性的钙离子结合位点和典型的内质网滞留信号肽（K/H）DEL（Michalak *et al*.，1992，1999）。生物信息学分析表明，本研究克隆获得的一段 ORF 编码的蛋白序列具有上述特征，而且与马铃薯甲虫 CRT 氨基酸序列一致性高达 92.5%，因此将该序列命名为 GdCRT。

CaM 是一种重要的调节蛋白，能结合第二信使 Ca^{2+} 和多种靶蛋白，调节多种细胞过程和发育。*GdCaM* 在沙葱萤叶甲成虫滞育前（羽化后 3 d）的表达量最高，随后在进入滞育后（羽化后 7 d）表达量显著下降（图 4：A），这一规律与棉铃虫幼虫滞育过程 CaM 水平降低（Lu and Xu，2010；Zhang *et al*.，2012）相一致；淡色库蚊滞育的各阶段中 CaM 表达也呈现显著变化，表明 CaM 可能在滞育过程中起重要的调控作用（Zhang *et al*.，2019）。但在解除滞育后，*GdCaM* 表达量进一步下降的原因尚不清楚。Teets 等（2013）发现钙信号介导昆虫冷感应，当 25℃下降到 0℃，细胞内钙离子浓度增加 40%，并使得钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ（CaMKII）活性升高。与本研究中发现短时高温和低温胁迫均导致 *GdCaM* 表达量上调，而 0℃时 *GdCaM* 的表达量低于 5℃时的（图 5：A），可能是过低的温度使得 *GdCaM* 表达受到抑制。

CAPSL 也属于钙结合蛋白 EF-hand 家族，可能与 CaM 存在相互作用（Klimmeck *et al*.，2008）。*CAPSL* 在沙葱萤叶甲成虫滞育中后期（羽化后 40－60 d）表达量显著上调（图 4：B）。Zhao 等（2017）也发现，与非滞育对照相比，*CAPSL* 在二斑叶螨滞育第 3 和第 13 天表达量显著上调。说明 GdCAPSL 可能与沙葱萤叶甲滞育调控有关。

TnC 通过结合钙离子发挥其生物学功能，TnC 随着细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高，引起肌动蛋白与肌球蛋白发生相互作用，产生肌肉收缩或扩张（Filatov *et al*.，1999），肌肉结构的稳定性在寒冷生存过程中起着至关重要的作用（Zhao *et al*.，2017）。本研究中发现，*GdTnCl* 的表达量随着温度的降低而上升（图 5：C），表明 GdTnCl 可能通过参与调节肌肉结构的稳定性，进而提升昆虫在寒冷条件下的适应能力。*GdTnCl* 在沙葱萤叶甲成虫滞育初期（羽化后 7－20 d）表达量上调，在滞育中后期（羽化后 30－60 d）下调表达（图 4：C）。尖音库蚊 *Culex pipiens* 中发现肌动蛋白（actin）在滞育初期表达量上调，滞育后期又回到低水平（Kim *et al*.，2006）。GdTnCl 可能通过对肌动蛋白的作用间接调控细胞骨架系统，引起细胞骨架系统重排，通过结构组分改变对沙葱萤叶甲夏滞育做出反应。

GdCRT 在沙葱萤叶甲成虫滞育期间（羽化后 7－60 d）的表达量显著低于滞育前（羽化后 3 d）和解除滞育后（羽化后 90 d）（图 4：D），CRT 可能通过表达量的下调来调控神经递质的释放，进而诱导昆虫进入滞育。在棉铃虫滞育期幼虫滞育诱导过程中，同样发现 CRT 表达量水平下降（Lu and Xu，2010）。另外，沙葱萤叶甲成虫羽化 110 d 时 *GdCAPSL* 和 *GdCRT* 的表达量达到最高值，而 *GdTnCl* 的表达量降为最低值，此时雌雄成虫已经进行交尾受孕，我们推测对应的 3 种 CaBP 可能在生殖过程中也发挥着潜在作用。

本研究首次成功克隆了 4 个沙葱萤叶甲钙结合蛋白基因，并进行了分子特性及在成虫发育过程中和不同温度下的表达分析，为进一步明确钙结合蛋白在沙葱萤叶甲发育和成虫滞育中的作用奠定了基础。

参考文献（References）

Ababou A，Zaleska M，2015. Electrostatics effects on Ca^{2+} binding and conformational changes in EF-hand domains：functional implications for EF-hand proteins. *Arch. Biochem. Biophys*.，587：61－69.

Asgari S，Schmidt O，2003. Is cell surface calreticulin involved in phagocytosis by insect hemocytes? *J. Insect Physiol*.，49（6）：545－550.

Bahk S, Jones WD, 2016. Insect odorant receptor trafficking requires calmodulin. *BMC Biol*., 14(1): 83.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD, 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*., 1(1): 11-21.

Brown PT, Herbert P, Woodruff RI, 2010. Vitellogenesis in *Oncopeltus fasciatus*: PLC/IP3, DAG/PK-C pathway triggered by CaM. *J. Insect Physiol*., 56(9): 1300-1305.

Brubaker-Purkey BJ, Woodruff RI, 2013. Vitellogenesis in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*: antagonists demonstrate that the PLC, IP3/DAG, PK-C pathway is triggered by calmodulin. *J. Insect Sci*., 13(1): 68.

Chen J, Chen J, Gai Q, Lv Z, Wang D, Nie Z, Wang J, Wang X, Wu X, Zhang Y, 2008. Molecular characterization and immunohistochemical localization of a novel troponin C during silkworm development. *Cell Tissue Res*., 331(3): 725-738.

Chen L, Tan Y, Zhou X, Pang B, Shan Y, Zhang Z, 2019. Molecular cloning, characterization and expression analysis of the heat shock protein gene *GdHsp10a* in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Plant Prot*., 46(2): 417-424. [陈龙, 谭瑶, 周晓榕, 庞保平, 单艳敏, 张卓然, 2019. 沙葱萤叶甲热激蛋白基因 *GdHsp10a* 的克隆、分子特征与表达分析. 植物保护学报, 46(2): 417-424]

Chen L, Tan Y, Zhou XR, Pang BP, Gexigeduren, Sun ZP, 2018a. Molecular cloning, characterization and expression analysis of trehalase gene *GdTre*1 in *Galeruca daurica* (Celeoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomol. Sin*., 61(3): 271-281. [陈龙, 谭瑶, 周晓榕, 庞保平, 格希格都仁, 孙志鹏, 2018a. 沙葱萤叶甲海藻糖酶基因 *GdTre*1 的克隆、分子特性和表达分析. 昆虫学报, 61(3): 271-281]

Chen L, Zhou XR, Gao LJ, Tan Y, Pang BP, 2018b. Changes of sugar, protein and fat contents in *Galeruca daurica* adults during summer. *Acta Entomol. Sin*., 61(7): 808-814. [陈龙, 周晓榕, 高利军, 谭瑶, 庞保平, 2018b. 沙葱萤叶甲成虫越夏期间糖类、蛋白及脂肪含量的变化. 昆虫学报, 61(7): 808-814]

Choi JY, Whitten MMA, Cho MY, Lee KY, Kim MS, Ratcliffe NA, Lee BL, 2002. Calreticulin enriched as an early-stage encapsulation protein in wax moth *Galleria mellonella* larvae. *Dev. Comp. Immunol*., 26(4): 335-343.

Filatov VL, Katrukha AG, Bulargina TV, Gusev NB, 1999. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry*, 64(9): 969-985.

Fyrberg C, Parker H, Hutchison B, Fyrberg E, 1994. *Drosophila melanogaster* genes encoding three troponin-C isoforms and a calmodulin-related protein. *Biochem. Genet*., 32(3/4): 119-135.

Guo L, Li CY, Liang P, Chu D, 2019. Cloning and functional analysis of two Ca^{2+}-binding proteins (CaBPs) in response to cyantraniliprole exposure in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *J. Agric. Food Chem*., 67(40): 11035-11043.

Haeseleer F, Imanishi Y, Sokal I, Filipek S, Palczewski K, 2002. Calcium-binding proteins: intracellular sensors from the calmodulin superfamily. *Biochem Biophys. Res. Commun*., 290(2): 615-623.

Hao X, Zhou XR, Pang BP, Zhang ZR, Bao X, 2015. Morphological and biological characteristics of *Galeruca daurica* Joannis (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Agrest. Sin*., 23(5): 1106-1108. [昊翔, 周晓榕, 庞保平, 张卓然, 包祥, 2015. 沙葱萤叶甲的形态特征和生物学特性研究. 草地学报, 23(5): 1106-1108]

Hattori M, Nakamura M, Komatsu S, Tsuchihara K, Tamura Y, Hasegawa T, 2012. Molecular cloning of a novel calcium-binding protein in the secreted saliva of the green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 42(1): 1-9.

Hsieh HY, Gu SH, 2019. Expression of calcineurin in relation to the embryonic diapause process in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 228(2): 35-42.

Jing YP, Liu W, Wang JX, Zhao XF, 2015. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone via nongenomic pathway activates Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II to regulate gene expression. *J. Biol. Chem*., 290(13): 8469-8481.

Ju C, Peng JX, Xu B, Wang W, Feng Z, Hu W, 2006. Cloning, expression and phylogenetic analysis of *Schistosoma japonicum* calcyphosine gene. *Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis*., 24(5): 360-365. [鞠川, 彭建新, 徐斌, 王玮, 冯正, 胡薇, 2006. 日本血吸虫钙磷蛋白基因的克隆、表达及其进化分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 24(5): 360-365]

Kim M, Robich RM, Rinehart JP, Denlinger DL, 2006. Upregulation of two actin genes and redistribution of actin during diapause and cold stress in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. *J. Insect Physiol*., 52(11/12): 1226-1233.

Klimmeck D, Mayer U, Ungerer N, Warnken U, Schnölzer M, Frings S, 2008. Calcium-signaling networks in olfactory receptor neurons. *Neuroscience*, 151(3): 901-912.

Li Q, Zhang H, Pang Y, 2017. The structure, properties and biological functions of CaM. *J. Liaoning Norm. Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 40(1): 74-82. [李庆伟, 张憾, 逄越, 2017. 钙调蛋白结构、性质及其细胞生物学功能的研究进展. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 40(1): 74-82]

Lindner A, Marbach F, Tschernitz S, Ortner C, Berneburg M, Felthaus O, Prantl L, Kye MJ, Rappl G, Altmüller J, Thiele H, Schreml S, Schreml J, 2019. Calcyphosine-like (CApsL) is regulated in Multiple Symmetric Lipomatosis and is involved in adipogenesis. *Sci. Rep*., 9(1): 8444.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402-408.

Lu YX, Xu WH, 2010. Phosphoproteomic analysis at diapause initiation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J. Proteome Res*., 9(10): 5053-5064.

Ma HY, Zhou XR, Tan Y, Pang BP, 2019. Proteomic analysis of adult *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) at different stages during summer diapause. *Comp. Biochem. Physiol. Part D*, 29: 351-357.

Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M, 1999.

Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J.*, 344(2): 281 – 292.

Michalak M, Milner RE, Burns K, Opas M, 1992. Calreticulin. *Biochem. J.*, 285(3): 681 – 692.

Mohanta TK, Yadav D, Khan AL, Hashem A, Abd Allah EF, Al-Harrasi A, 2019. Molecular players of EF-hand containing calcium signaling event in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(6): 1476.

Mukunda L, Miazzi F, Kaltofen S, Hansson BS, Wicher D, 2014. Calmodulin modulates insect odorant receptor function. *Cell Calcium*, 55(4): 191 – 199.

Mukunda L, Miazzi F, Sargsyan V, Hansson BS, Wicher D, 2016. Calmodulin affects sensitization of *Drosophila melanogaster* odorant receptors. *Front. Cell. Neurosci.*, 10: 28.

Qiu F, Lakey A, Agianian B, Hutchings A, Butcher GW, Labeit S, Leonard K, Bullard B, 2003. Troponin C in different insect muscle types: identification of two isoforms in *Lethocerus*, *Drosophila* and *Anopheles* that are specific to asynchronous flight muscle in the adult insect. *Biochem. J.*, 371(3): 811 – 821.

Ramos IB, Campos CBL, Sorgine MHF, de Souza W, Machado EA, 2011. Calreticulin expression levels and endoplasmic reticulum during late oogenesis and early embryogenesis of *Rhodnius prolixus* Stahl. *Mol. Biol. Rep.*, 38(3): 1757 – 1767.

Seno K, Nakamura T, Ozaki M, 2005. Biochemical and physiological evidence that calmodulin is involved in the taste response of the sugar receptor cells of the blowfly, *Phormia regina*. *Chem. Senses*, 30(6): 497 – 504.

Stoltzfus JR, Horton WJ, Grotewiel MS, 2003. Odor-guided behavior in *Drosophila* requires calreticulin. *J. Comp. Physiol. A*, 189(6): 471 – 483.

Tan Y, Zhang Y, Huo ZJ, Zhou XR, Shan YM, Pang BP, 2017. Molecular cloning and expression profiling of the heat shock protein gene *GdHsp*70 in *Galeruca daurica* Joannis (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomol. Sin.*, 60(8): 865 – 875. [谭瑶, 张玉, 霍志家, 周晓榕, 单艳敏, 庞保平, 2017. 沙葱萤叶甲热激蛋白基因 *GdHsp*70 的克隆与表达模式分析. 昆虫学报, 60(8): 865 – 875]

Tan Y, Zhou XR, Pang BP, 2017. Reference gene selection and evaluation for expression analysis using qRT-PCR in *Galeruca daurica* (Joannis). *Bull. Entomol. Res.*, 107(3): 359 – 368.

Teets NM, Yi SX, Lee ERJr, Denlinger DL, 2013. Calcium signaling mediates cold sensing in insect tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(22): 9154 – 9159.

Tidow H, Nissen P, 2013. Structural diversity of calmodulin binding to its target sites. *FEBS J.*, 280(21): 5551 – 5565.

Umasuthan N, Elvitigala DAS, Revathy KS, Lee Y, Whang I, Park MA, Lee J, 2013. Identification and in silico analysis of a novel troponin C like gene from *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae) and its transcriptional response for calcium challenge. *Gene*, 519(1): 194 – 201.

Wang C, Zhang LJ, Fan JJ, Ruan YY, Cui ZH, 2009. Calcium-binding proteins in plants. *Plant Physiol. Commun.*, 45(3): 209 – 216. [汪澈, 张立军, 樊金娟, 阮燕晔, 崔震海, 2009. 植物钙结合蛋白. 植物生理学通讯, 45(3): 209 – 216]

Wang L, Fang Q, Zhu J, Wang F, Akhtar ZR, Ye G, 2012. Molecular cloning and functional study of calreticulin from a lepidopteran pest, *Pieris rapae*. *Dev. Comp. Immunol.*, 38(1): 55 – 65.

Wang W, Wan P, Lai F, Zhu T, Fu Q, 2018. Double-stranded RNA targeting calmodulin reveals a potential target for pest management of *Nilaparvata lugens*. *Pest Manag. Sci.*, 74(7): 1711 – 1719.

Ye WF, Yu HX, Jian YK, Zeng JM, Ji R, Chen HD, Lou YG, 2017. A salivary EF-hand calcium-binding protein of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* functions as an effector for defense responses in rice. *Sci. Rep.*, 7(1): 40498.

Zhang CX, Wei DD, Shi GH, Huang XL, Cheng P, Liu GX, Guo XX, Liu LJ, Wang HW, Miao F, Gong MQ, 2019. Understanding the regulation of overwintering diapause molecular mechanisms in *Culex pipiens pallens* through comparative proteomics. *Sci. Rep.*, 9(1): 6485.

Zhang G, Schmidt O, Asgari S, 2006. A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. *Dev. Comp. Immunol.*, 30(9): 756 – 764.

Zhang Q, Lu YX, Xu WH, 2012. Integrated proteomic and metabolomic analysis of larval brain associated with diapause induction and preparation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J. Proteome Res.*, 11(2): 1042 – 1053.

Zhao JY, Zhao XT, Sun JT, Zou LF, Yang SX, Han X, Zhu WC, Yin Q, Hong XY, 2017. Transcriptome and proteome analyses reveal complex mechanisms of reproductive diapause in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Insect Mol. Biol.*, 26(2): 215 – 232.

Zhou XR, Gao JC, Pang BP, 2016. Effects of temperature on the termination of egg diapause and post-diapause embryonic development of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.*, 45(4): 1076 – 1080.

（责任编辑：马丽萍）